NO センサー蛋白質, 可溶性グアニレートシクラーゼ (sGC) の共鳴ラマン分光による構造化学的研究

北　川　禎　三*

Resonance Raman Investigation on Structural Chemistry of an NO Sensor Protein, Soluble Guanylate Cyclase

Teizo KITAGAWA

Soluble guanylate cyclase (sGC) is an enzyme catalyzing the conversion of GTP to cGMP and is activated by NO. CO also activates it, albeit marginally. However, it was found that the shared presence of CO with certain effector molecules like YC-1 and BAY synergistically stimulates the enzymatic activity to the level of NO-bound sGC. In this study the influence of YC-1 and BAY on the CO-heme structure of bovine lung sGC was investigated with resonance Raman spectroscopy. The effectors produced a five-coordinate (5c) CO-heme in addition to the His-bound six-coordinate (6c) CO-heme, and their Soret maxima were determined by simulation. On the basis of the absorption intensity, the amount of the 5c species was not dominant in contrast to the high activity. The heme structural features common to the 5c and 6c CO-hemes generated by effectors are that the vinyl and propionate side chains are more coplanar to the pyrrole rings. The out-of-plane Raman bands were observed only for the 5c species, for which the saddling and propeller distortions of heme were deduced to be large. The Fe-CO stretching bands of the 5c species at 522 cm^{-1} and of the 6c species at 488 cm^{-1} were most enhanced upon Raman excitation at 407 and 422 nm, respectively, which is consistent with the simulated absorption spectra. Unexpectedly, the $^{13}C^{18}O$-isotope sensitivity appeared in a few low frequency porphyrin modes. From these observations, we propose that the high catalytic activity of sGC-CO in the presence of effectors is a result of the concerted effects of protein conformational changes triggered by certain local interactions between the heme side chains and effectors/substrate in the heme pocket, which partly induce the cleavage of the Fe-His β105 bond.

1. 序　　文

ガスセンサー蛋白質の構造化学的研究の一環として, 本年は NO センサーの可溶性グアニレートシクラーゼ (sGC) を調べた. sGC は主に血管内皮細胞や脳細胞の細胞質に存在するヘテロダイマー蛋白 (α; 73-82 kDa, β: ～70 kDa) で, グアノシン-3 リン酸 (GTP) をサイクリックグアノシン-1 リン酸 (cGMP) に変換する酵素である[1)2)]. この酵素は 1 個の鉄プロトポルフィリンを β サブユニットに持ち, 生体内で NO 合成酵素 (NOS) によって作られる一酸化窒素 (NO) の生理的受容体として働く[1)]. 精製したままの酵素は 5 配位 (5c) 高スピン (hs) Fe(II) ヘムを持ち, β105 番目のヒスチジン (Hisβ105) がヘム鉄に共有結合で結合している[3)]. NO はそのトランス位に結合する[4)]. ヘムは空気中で還元状態にあり, βサブユニット内でヘムのプロピオン酸側鎖と Tyrβ135 や Argβ139 との相互作用で安定化されている[5)]. それ故, sGC とアミノ酸配列の似ている *Tt*Tar4 H (細菌の蛋白) で見つけられたように[6)], ヘムが歪んでいるかもしれない. sGC の Fe(II)-Hisβ105 伸縮振動 ($\nu_{Fe\text{-}His}$) の振動数が著しく低い事[7)8)]は, 大きな歪みと矛盾しない. NO がヘムに結合すると, NO の強い配位力のトランス効果により, Fe(II)-Hisβ105 結合が切断され, 5 配位 (5c) の NO ヘムが出来る[8)9)]. この様子は, ヒトヘモグロビンの低親和性構造に NO が結合した時の α サブユニットに見られる現象[10)]に似ている. sGC でも NO の結合により Fe-His 結合

2010 年 1 月 20 日 受理
* 豊田理化学研究所フェロー

が切断され, ヘムと蛋白間の張力が緩和されて, 四次構造変化が誘起される. その結果ヘムから離れた場所にある触媒部位で構造変化が起り, 酵素活性が約 400 倍高くなる[9]. しかしそのメカニズムはわかっていない. これを説明するためのモデルがいくつか提案されているが, 合意に至っていない[4)11)].

一酸化炭素 (CO) もまた sGC を活性化するが, ほんの少しだけである[12]. しかしながら, CO の結合した sGC (sGC-CO) は, ある種の外部導入小分子 {3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazole (YC-1) や 3-(4-amino-5-cyclopropylpyrimidin-2-yl)-1-(2-fluoroben-zyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine (BAY 41-2272, 以後 **BAY** と略す)} の存在により, NO の結合した sGC と同じレベルまで酵素活性が高くなる事が見つけられた[13)14)]. その説明として, Fe(II)-Hisβ105 結合が切断され, CO の結合した 5 配位ヘムの生成している事が高い活性の原因であると, いくつかのグループが提案した[14)~16)]. しかしながら, 5c CO-ヘムの Fe-CO 伸縮振動ラマンバンドの強度が 6c CO-ヘムのそれに比べて非常に弱いことから, Fe(II)-Hisβ105 結合が切断された sGC-CO の存在量が, 高い酵素活性を説明するには少なすぎるのでないかという疑問が出されていた[17]. 5c sGC-CO の生成は振動分光学で証明されたが, Fe(II)-Hisβ105 結合の切断が sGC-CO の高い酵素活性に必ずしみ必須ではないと云う意見もあった[17)18)].

一方我々は, sGC-CO のヘムポケット内のヘムビニル側鎖の近くに YC-1 が結合し, GTP が 5c CO-ヘムの生成を容易にしているデータを示したが[15], 更に進めて上記の疑問に答えることが本研究の目的である. 共鳴ラマンスペクトルの強度は必ずしも存在量を反映しない. そこで本研究では, 5c 及び 6c の sGC-CO のラマンバンドと吸収極大との相関を見つけ, 5c や 6c の sGC-CO の存在量を吸収スペクトル強度から見積もることを狙った. 更に, 5c 及び 6c の CO ヘムの歪みの大きさを推定する方向に研究を進めた. と云うのは, ヘムの面外変形が蛋白の四次構造変化を誘起し, その結果として酵素活性を高める事があり得ると考えたからである. 確かに 407 nm のレーザー光でラマン散乱を測定すると 5c CO-ヘムのラマンバンド強度は相当に強くなったが, 吸収スペクトル強度から判断すると 5c CO-ヘムが主成分とは考えにくかった. それで我々は, 5c と 6c の両方の sGC-CO が共に高い活性を持つと考え, エフェクター分子による酵素活性化の新しいメカニズムをここに提案する.

2. 実　　験

2.1. sGC の精製

酵素は既に述べた方法[8)15)]にしたがって, ウシの新鮮な肺から単離, 精製した. 新鮮なウシ肺 (4 kg) をミンチ肉にし, 4L の緩衝液 (25 mM TEA-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM benzamidine, 1 mg/mL protease inhibitor) で均質化した後, 遠心分離した. 100000 g の上澄み液を 1000 mL の DEAE Sepharose Fast Flow カラム (GE Healthcare) につけ, 上記緩衝液で洗浄した. それを, NaCl で 0.05〜1.05 M の線形濃度勾配を付けて 2L の NaCl 溶液で 120 mL/h の速度で溶出した. NO 感受性のグアニレ-トシクラーゼ活性を示すフラクションを集めた.

硫酸アンモニウム 23〜41%-飽和によって沈殿した部分を集め, 少量の緩衝液 A (25 mM TEA, 5 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 mg/L protease inhibitor) に溶解させて, 同じ緩衝液に対して透析した. そこに $MnCl_2$ を加えて 4 mM の濃度にし, 透析した液を 15000 g で遠心した. その上澄み液を, 予め平衡をとった GTP-アガロースカラム (100 mL) につけ, 4 mM $MnCl_2$ を含む緩衝液 A で洗浄, 4 mM $MnCl_2$ から 8 mM ATP への線形勾配を付けた緩衝液 A で溶出した. NO-感受性の GC 活性をを持つフラクションを Amicon-30 濃縮器或は, 50%-飽和の硫酸アンモニウムで濃縮した後, 緩衝液 A に対して透析した. その内液を, 予め緩衝液 A で平衡をとったヒドロキシアパタイトカラム (30 mL) につけ, リン酸緩衝液で 0〜200 mM の線形濃度勾配をつけて溶出した. NO-感受性の GC 活性をもつフラクションを更に濃縮した後, 予め 5 mM DTT を含む 25 mM TEA-HCl (pH 7.4) で平衡をとった Superdex 200 pg で体積選別クロマトグラフィーにかけた. sGC を含むフラクションを再濃縮し, 先に述べた方法[8]で活性を調べ, 測定まで 77K で保存した. NO 誘起の sGC 活性を調べる際には, Na-nitropruside を用いて NO を発生させた.

2.2. 共鳴ラマンスペクトル測定

共鳴ラマン (RR) スペクトルの測定に当たっては, 5 mM DTT を含む pH 7.4 の 50 mM TEA 緩衝液に溶解させた 10〜30 μM sGC 溶液を用いた. sGC-CO を得るために, 約 80 mL の sGC 溶液を気密の回転ラマンセルに入れ, ゴム隔壁を通して 0.1 mmHg までの脱ガスと純窒素ガス封入を繰り返した後, CO ガスを気密の注射器により,セルの上部気相に導入した. 回転セルの温度は, 液体窒素ガスの吹き付けにより, 約 20〜10℃ に保った.

ラマン散乱はクリプトンイオンレーザー (Spectra Physics, model BeamLok 2060) の 406.7 と 413.1 nm, 及びダイオードレーザー (日立金属, モデル ICD-430) の 429 と 422 nm の発振線で励起した. 直角方向の散乱光を集光し, シングルポリクロメータ (リツー応用光学) で分散して, 液体窒素冷却の CCD 検出器 (Princeton Instruments, model ICCD-1024 MG-E/I) で検出した. ラマンシフトはインデンとトルエンで波

数較正した. 波数精度はシャープなバンドに対しては ±1 cm^{-1} である. レーザーパワーはサンプル点で 200 μW と 5 mW の間である. スペクトル積算時間は, 断らない限り 5〜30 分で, ラマンスペクトル測定前後で UV-可視吸収スペクトルが変化してない事を常に確認した. もし少しでも変化があれば, そのラマンスペクトルは捨てた. スペクトルデータは IgorPro (WaveMetrics, USA) を用いて解析した. スペクトルの curve-fitting にも同じプログラムを用いた.

UV-可視吸収スペクトルは Gaussian 関数を用いて fitting した. 4 種の異なる励起波長で測定したラマンスペクトルは Lorentz 関数を用い, 制約を何もつけずに fitting した. 計算で再生したスペクトルは実測スペクトルをよく再現した. バンドのピーク位置と強度を異なる励起波長のスペクトル間で比較した. どのようなプログラムを用いても, fitting したスペクトルには一般的に, fitting そのもの或はバンドの重なりに由来する不確定性がある程度含まれる. 本解析では, fitting したスペクトルのピーク波数は報告されている値と誤差範囲で一致した. ピーク強度に関しては, バンドの重なりに対する一義的な分離法が確立されていないため, 不確定性が幾分大きい. Fitting 残差から推定される不確定性は小さいと思われたので, エラーの大きさは fitting したバンドのベースラインが共通のベースラインからずれている程度で表した.

3. 結　　果

今回精製した酵素が, 前回の報告に用いた酵素と同じ生化学的性質[8)15)]を持っている事を確認した. 精製したままの sGC の Soret 帯領域の吸収スペクトルを図 1(A) の曲線 (b) に示す. この酵素の Soret 帯は 431 nm に認められ, 前回の報告値[8)15)]とよく一致するので, Fe(II)-His β 105 の結合した 5c hs 状態のヘムを持っていると思われる. この 5c hs 状態のヘムに O_2 は結合しないので, 空気中では酸化されない[12)]. CO ガスを気相に入れると, 図 1(A) の曲線 (a) の実線で示すように, 吸収ピークは 424 nm にシフトし強くなった. この 424 nm のバンドは 3 つの Gaussian バンドに分解する事ができ, それらをベースラインをずらせて点線で示してある. その成文バンドは, 424, 418, 438 nm にピークを与える. この点線のスペクトルの和を計算すると, (a) の破線で示したようになり, 実線で示した実測スペクトルと殆ど一致する. その計算したスペクトル (破線) と実測スペクトル (実線) の差スペクトルを図 1(A) の上部に曲線 (c) として示す.

同様な測定を YC-1 と GTP の共存下で行い, 図 1(A) と同じ定義のもとで図 1(B) に示す. YC-1 の存在下では, 図 1(B) の点線で示したように, 図 1(A) の 424 nm のバンドは 420 nm にブルーシフト (曲線 (a)) し, 418 nm のバンドは消えるが代りに 410 nm に新しいバンドが現れる. 438 nm のバンドは変わらずに残る. この成分バンドの和が曲線 (a) の破線で示されているが, 実測スペクトル (実線) とよく一致する. 図 1(B) の曲線 (b) に見られるように, 実測スペクトルと計算スペクトルの差ピークは認められない.

前に報告した共鳴ラマンスペクトルの研究[15)]で, YC-1 と GTP の存在しない状態で, 2 本の Fe-CO 伸縮ラマンバンド（ν_{Fe-CO}）が観測された事から 2 種類の 6c CO-ヘムの存在が指摘されていたが, 本研究における吸収スペクトルのバンド分解で, 2 つの 6c CO-ヘムが吸収極大（λ_{max}）を 424 と 418 nm に持つ事が明らかになった. しかし何故か 418 nm のバンドは非常に幅広い. YC-1 と GTP の存在下でも 2 つの主な吸収帯が現れたが, 別

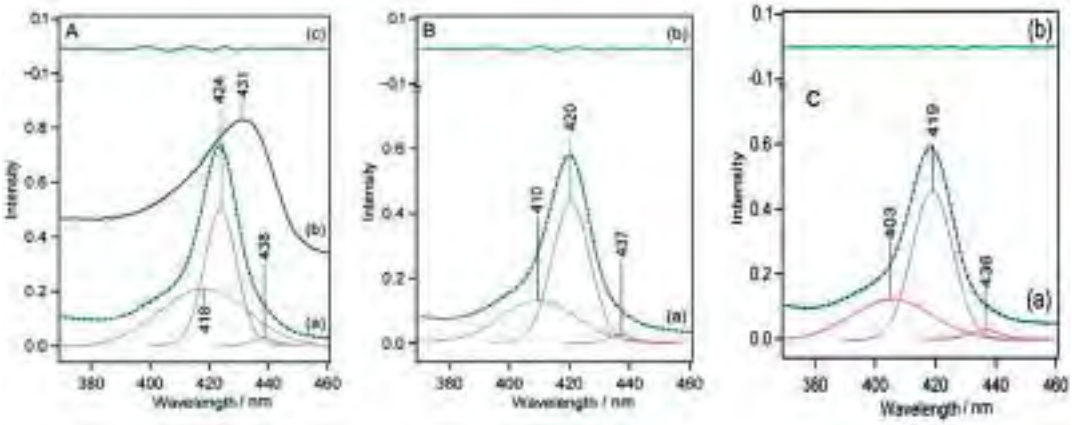

Figure 1. Absorption spectra of sGC sGC-CO in the absence of any effectors (A) and the presence of YC-1 (140 μM) and GTP (1 mM) (B) and of 150 μM BAY and 1 mM GTP (C). Native sGC, as isolated, is also incorporated in A (b, blue trace). Cyan lines indicate the observed spectra (a). Red dotted lines represent the deconvoluted spectra fitted with Gaussian functions and broken lines show their digital sum (a). The curves c in A and b in B and C (green) in the upper part denote the difference between the observed and simulated spectra.

な波長である. 主たるバンドは 420 nm にあり, もう一つのバンドは 410 nm にある. この 410 nm の吸収バンドは幅広い. 両方の図で 438–437 nm にある弱いバンドを与える分子種は現段階ではよくわからないが, 多分 CO の結合してない sGC に由来するが, 図 1(A) の曲線 (b) では 431 nm の強い吸収に隠されて見えないのであろうと想像される. 異なる λ_{max} をもつ 2 種の sGC-CO のそれぞれの性質を調べるために, その混合溶液の共鳴ラマンスペクトルを同じ条件下で, 異なるラマン励起波長で測定した.

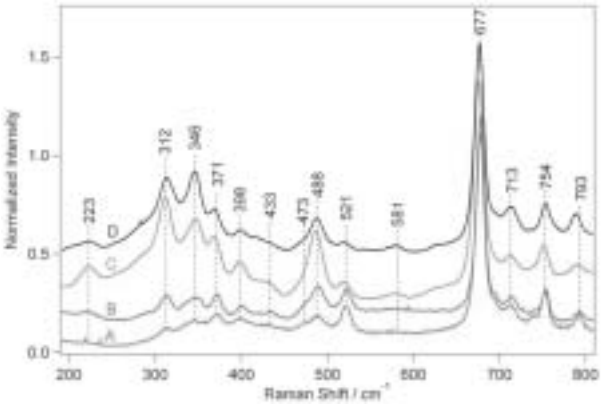

Figure 2. Comparison of RR spectra in the low wavenumber region of sGC-CO in the presence of YC-1 (140 μM) and GTP (1 mM) excited at different wavelengths. A: 406.7 nm, B: 413.1 nm, C: 422 nm and D: 428.7 nm.

YC-1 と GTP の共存下で sGC-CO の共鳴ラマンスペクトルを 406.7(A), 413.1(B), 422(C), 及び 428.7 nm(D) で測定した結果を図 2 に示す. 全てのスペクトル強度は 677 cm^{-1} のラマンバンドで標準化してある. 677 cm^{-1} のバンドはヘムの ν_7 モードに由来するが, YC-1 の溶媒として用いた DMSO のバンドが非常に弱く重なっている. 488 cm^{-1} と 473 cm^{-1} のバンドは, 共に CO の同位体でピーク振動数がシフトしたので, 6c CO-ヘムの ν_{Fe-CO} モードに帰属された[15]. その 2 本の ν_{Fe-CO} バンドは, YC-1 と GTP の無い条件下では, 473 cm^{-1} バンドが主で 488 cm^{-1} バンドが肩であったのに, YC-1 と GTP の添加により相対強度が逆転して, 488 cm^{-1} バンドが主になった.

422 nm 励起のスペクトルに対して, CO 同位体を用いて測定した結果を図 3 に示す. ここでスペクトル (D) と (E) はそれぞれ $^{12}C^{16}O$ と $^{13}C^{18}O$ 用いて測定したもので, 図 2(C) の 488 と 473 cm^{-1} のピークが $^{13}C^{18}O$ ではそれぞれ 472 と 462 cm^{-1} シフトとしている事が, 同位体差スペクトル (図 3F) よりわかる. これに加えて, 521 cm^{-1} のバンドが CO 同位体で 507 cm^{-1} にシフトしている. このバンドは振動数から判断して, 5c CO-ヘムの

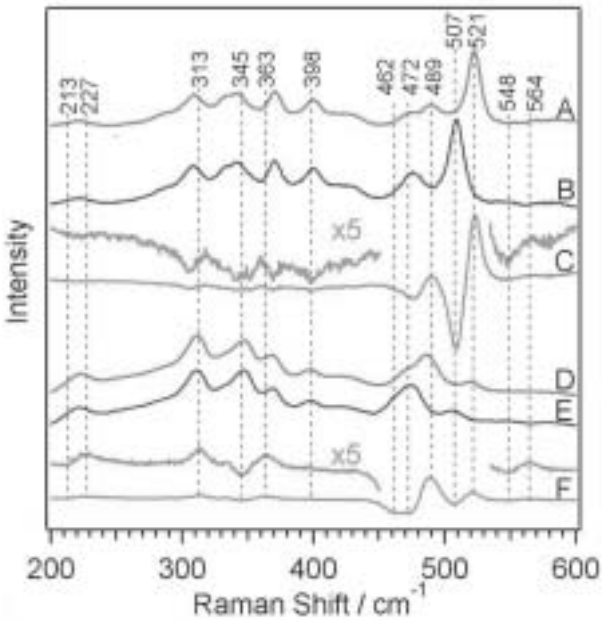

Figure 3. Isotope difference spectra of sGC-CO in the presence of effecters. A and B: in the presence of 150 mM BAY and 1 mM GTP, D and E: in the presence of 200 mM YC-1 and 1 mM GTP. A and D: sGC-$^{12}C^{16}O$, B and E: sGC-$^{13}C^{18}O$. C: Difference spectrum, A-B, F: Difference spectrum, D-E. Excitation wavelength for A and B :407 nm; D and E: 422 nm.

ν_{Fe-CO} に帰属される[14)~16)]. このバンドは, 図 2 の 422 nm 励起のスペクトル (C) では弱いが, 406.7 nm 励起のスペクトル (A) ではかなり強い. これらの結果から, YC-1 と GTP の無い条件下で観測された図 1(A) の 424 nm と 418 nm の吸収を与える分子種は, それぞれ ν_{Fe-CO} を 473 cm^{-1} と 488 cm^{-1} に与え, YC-1 と GTP の存在下で観測された図 1(B) の 420 nm と 410 nm の吸収を与える分子種は, それぞれ ν_{Fe-CO} を 488 cm^{-1} と 521 cm^{-1} に与える事が明らかになった. 図 3 (F) では, この ν_{Fe-CO} バンド以外に, $^{12}C^{16}O/^{13}C^{18}O$ 同位体差ピークが 565/548, 363/345, 227/213cm^{-1} に認められる. これらの同位体感受性バンドの幾つかは, sGC-CO/BAY/GTP システムのスペクトル[14)]に対しては指摘されていないので, その系に対しても本酵素を用いて 406.7 nm 励起で測定した. その結果を図 3 のスペクトル (A) (B) (C＝A－B) に示す. CO 同位体感受性ラマンバンドの YC-1 の影響に関する牧野らの報告[16)]に反し, 589 cm^{-1} には同位体鋭敏バンドを同定することはできなかった.

図 2 で, 488 cm^{-1} のバンドが 420 nm 励起のスペクトル (C) で最も強い事は, そのバンドが図 1(B) の 420 nm 吸収分子種に由来する考えと, ラマン共鳴効果の理論に合致し, その分子種が 6c の sGC-CO である事が明

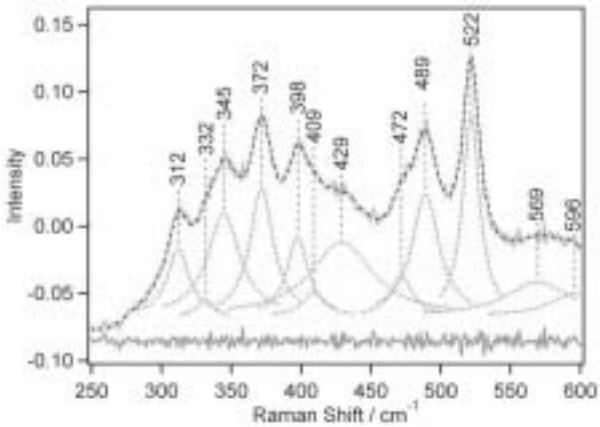

Figure 4. Curve-fitting of the RR spectra in the low wavenumber region (250–600 cm^{-1}) of sGC-CO in the presence of YC-1 (140 μM) and GTP (1 mM). The solid line denotes the 406.7-nm excited spectrum (the same as A in Fig. 1). The red dotted lines indicate the component bands fitted with Lorentzian functions and the broken line the digital sum. The line at the bottom shows the difference between the observed and simulated spectra.

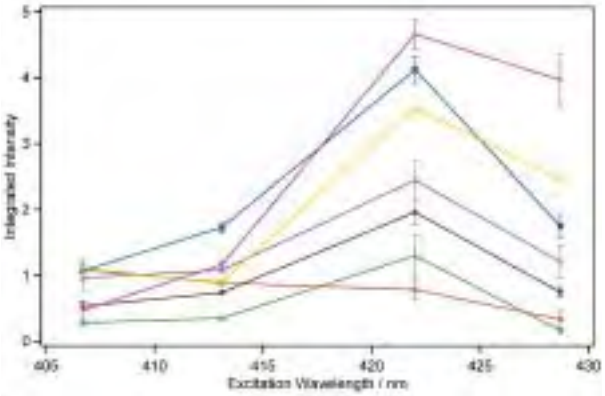

Figure 5. Excitation wavelength dependence of intensities of certain selected Raman bands. The area intensities of the simulated component bands are plotted against the excitation wavelength. Represented are bands at ◇312, □345, ○372, ◆398, ▲472, ■489, ●522 cm^{-1}.

らかになった. 一方, 521 cm^{-1} のバンドは 406.7 nm 励起で強いので, 図 1(B) の 410 nm 吸収分子種が 5c の sGC-CO に対応する事が本研究で明らかになった.

これまで 521 cm^{-1} のラマンバンド強度が弱いので 5c sGC-CO の存在量が問題にされたが, 488 cm^{-1} と 521 cm^{-1} のラマンバンド強度はラマン励起波長に非常に鋭敏である事が図 2 の実験で明らかになり, それらの相対強度は 429 と 407 nm 励起のスペクトルで大きく異なる. 223 と 312 cm^{-1} のバンドは 488 cm^{-1} バンド

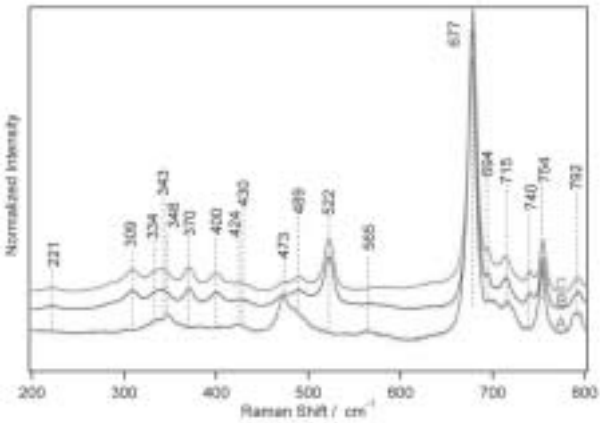

Figure 6. Low wavenumber RR spectra of sGC-CO in the absence (A) and presence of BAY (150 μM, B) and BAY (150 μM) and GTP (1 mM) (C). Excitation wavelength: 406.7 nm.

が強い時に顕著である. それとは対照的に, 694 (γ_{15}) や 740 (γ_1) の面外変角振動に由来するバンドは, 521 cm^{-1} のバンドが強い時に認められる. ラマンバンド強度の励起波長依存性をはっきりさせるために, IgorPro ソフトを用いて band fitting をした. 例として図 2 のスペクトル (A) を Lorentz 関数で fitting した結果を図 4 に示す. ここで, 実線が実測スペクトル, 点線がバンド分解した成分スペクトル, 破線がその和で, 実線と破線のずれを下側に示してある. そこには特別のピークがないので, 破線のスペクトルは実測スペクトルをよく再現しているといえる.

そのようなバンド分解を図 2 の各スペクトル毎に行なった. 各バンドの強度を半値幅とピーク高さの積として評価し, 代表的なバンドの強度を励起波長に対してプロットしたものが図 5 である. 600 cm^{-1} 以下のバンドは, 図 5 から大きく 2 つに分類される. 第 1 は 521 cm^{-1} のバンドで, 励起波長が短くなるほど単調に強度増大を示すので, 図 1(B) の 410 nm 分子種に帰属される. 第 2 は 489, 473, 398, 371, 346, 及び 312 cm^{-1} のバンドで, 422 nm 励起で著しい強度増大を示すので, 図 1(B) の 420 nm 分子種に帰属される. 398, 372, 及び 345 cm^{-1} のバンドは 407 と 413 nm 励起で同じような強度をもつので, 521 cm^{-1} と 422 cm^{-1} バンドの特徴の両方の性質をもつ. 多分 2 つの分子種の対応する振動数が非常に近く, ラマンバンドが分離されなかったのであろう. このようにして, sGC-CO の 2 種の分子を λ_{max} で区別し, その存在量を吸収スペクトルで推定する一方, ヘムの構造をラマンバンドから議論する事が可能になった.

もう一つの代表的エフェクターである BAY の効果が YC-1 のそれと同じかどうかを見るために, 本研究の酵素を用いてそれを調べた. BAY と GTP 存在下の UV-可視吸収スペクトルを図 1(C) に, 共鳴ラマンスペクトルの

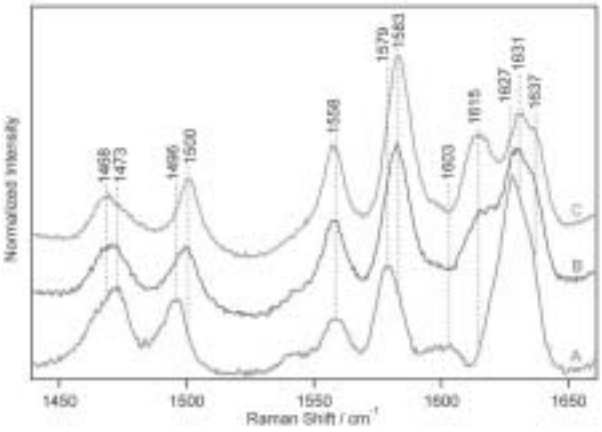

Figure 7. High wavenumber RR spectra of sGC-CO in the absence (A) and presence of BAY (150 μM, B) and BAY (150 μM) and GTP (1 mM, C). Excitation wavelength: 406.7 nm.

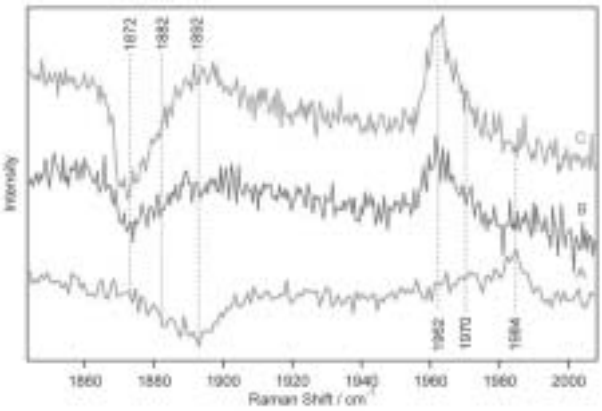

Figure 8. CO-isotope difference ($^{12}C^{16}O$-$^{13}C^{18}O$) spectra of sGC-CO in the absence (A) and presence of BAY (B) and BAY/GTP (C). Excitation wavelength: A: 422 nm, B and C: 406.7 nm.

低波数領域を図 6 に示す. 図 1(C) の各曲線の意味は (B) のそれらと同じである. 点線のスペクトルからわかるように, 実測スペクトルは 403, 419, 436 nm に λ_{max} をもつ 3 成分に分解される. 5c CO-ヘムの吸収極大は 403 nm にシフトしているが, 6c CO-ヘムのそれは 419 nm で YC-1 の場合 (図 1B) に近い.

BAY の sGC-CO の共鳴ラマンスペクトルに及ぼす影響は, 既に Martin ら[14]により報告されている. 図 6(b) に示すように, 522 cm^{-1} の ν_{Fe-CO} バンドが非常に強い事がその特色で, 報告[14]とよく一致する. この事は, 5c CO-ヘムが 403 nm に吸収極大を持つ事とつじつまが合う. 473 と 489 cm^{-1} の 6c CO-ヘムの ν_{Fe-CO} バンドの相対強度は, BAY の存在により大きく変わる (B) が, 更に GTP の添加によってあまり変わらない (C). YC-1 の場合は GTP の添加により大きく変わった事と対照的である. BAY の場合, 489 cm^{-1} に比べて 522 cm^{-1} のバンド強度が著しいが, 図 1(C) の吸収スペクトルの 403 と 419 nm の相対強度は YC-1 の場合とあまり変わっていない. したがって, ν_{Fe-CO} バンドの共鳴効果が BAY と YC-1 で異なっていると思われる. 694 と 740 cm^{-1} の面外振動由来のラマンバンド強度は YC-1 の場合より BAY の方が大きく, 521 cm^{-1} が強い時にバンドの存在がよりはっきりする.

ここで特別指摘したい事は, 400 cm^{-1} (ビニル基変角振動), 370 cm^{-1} (プロピオン酸基変角振動) 及び 309 cm^{-1} (ポルフィリン環モード) がスペクトル (B) で特に強くなる事である. BAY の場合の図 6 (c) と YC-1 の場合の 407 nm 励起のスペクトル (図 2A) を比較すると, それらの類似性, 特に 398, 371, 312 cm^{-1} のバンドの強度増大に気がつく. この事は, 5c CO ヘムと 6c CO ヘムの違いはあるが, エフェクターがこれらのバンドに及ぼす効果が本質的に同じである事を示唆する.

BAY の場合, GTP の効果は図 7 に示す高波数領域のスペクトルでもっと明確に現れ, スペクトル (C) に示すように, GTP 添加により 1615 cm^{-1} に新たなラマンバンドが現れる. このバンドはビニル基の C=C 伸縮振動 ($\nu_{C=C}$) に由来する. Marzocchi と Smulevich によって導かれた ($\nu_{C=O}$) 振動数とビニル基ねじれ角 (τ) との相関曲線[19]によると, 1615 cm^{-1} は τ=0〜10° に相当する. そして, τ の分布は 4-ビニル基の方が 2-ビニル基よりずっと狭いと指摘されている. $\nu_{C=O}$ バンドのラマン強度が強い事は, C=C 結合がピロール環とより大きく π 共役している事を示すので, 4-ビニル基がピロール環 2 と平面性を増している事を意味する.

ヘムに結合した CO の C-O 伸縮振動 (ν_{C-O}) は, 407 nm 励起のラマンスペクトルでは図 8 (A) に示すように, エフェクターがない状態では〜1984 cm^{-1} に弱く出る. BAY と GTP の存在下ではそれが 1962 cm^{-1} にシフトし, 1970 cm^{-1} に肩を持つ (図 8(C)). それらは $^{13}C^{18}O$ ではそれぞれ 1872 と 1882 cm^{-1} にシフトする (C). この 1962 cm^{-1} のバンドは 5c sGC-CO の (ν_{C-O}) に由来し, 1970 cm^{-1} のバンドが 6c sGC-CO 由来する. YC-1 と GTP の存在下では 5c sGC-CO の (ν_{C-O}) が 1969 cm^{-1} にある事を先に報告した[15]. このことから, ヘムに結合した CO の周りの疎水性環境が BAY と YC-1 とで少し違う事がわかる. (YC-1 の方が ν_{C-O} 7cm^{-1} 分, より疎水的である).

4. 考　　察

ヘムの 2-位と 4-位ビニル基の $C_{\beta}-C_a=C_b$ 変角振動のラマンバンドがそれぞれ 440 と 405 cm^{-1} に現れる事, 及び C=C 伸縮振動が 1621 cm^{-1} にある事がミオグロビン (Mb) の研究で明らかにされている[20][21]. 図 6(A) で 424 cm^{-1} に観測された sGC-CO の 2-ビニルモードは,

BAY の存在下 (図 6(C)) では弱くなり, 430 cm^{-1} にシフトしている. それとは逆に, 4-ビニルモードは BAY により強度がかなり強くなり, ～400 cm^{-1} に現れる (図 6(C)). 図 2(C) に見られるように, YC-1/GTP の場合の対応するラマンバンドが 398 cm^{-1} に強く現れ, その時に 488 cm^{-1} のバンドも強い. Mb に比べて $C_{\beta}-C_a=C_b$ 変角振動のラマンバンドが低波数シフトして強度が強くなる事は, 4-ビニル基がピロール環 2 との平面性を増し, π 共役が強くなった事を示唆する. 2-ビニル基は逆の振る舞いをしている. 換言すると, 2-ビニル基と 4-ビニル基が交換したようになり, 4-ビニル基の π 電子がピロール環 2 により非局在下している. この事は, 図 7(C) で指摘した 1615 cm^{-1} のビニル基 C=C 伸縮バンドが BAY と GTP の存在下で強度を持つようになった事とつじつまが合う.

370 cm^{-1} のヘム側鎖のプロピオン酸基のラマンバンド強度が増すことは, $C_{\beta}-C_a=C_b$ 変角振動がポルフィリン環骨格振動とカップリングを増して強度をもらっている事を意味し, これもピロール環との平面性を増したことを示唆する. ビニル基やプロピオン酸基などのヘム側鎖の振動モードが共鳴ラマンの強度を持つようになった事は, それら側鎖がエフェクターや基質の存在によりポルフィリン環との平面性を増した結果であり, それらの特徴は sGC-CO/YC-1/GTP の 420- と 410 nm の両分子種, 及び sGC-CO/BAY/GTP の 419 と 403 nm の両分子種に共通に見られる現象である.

図 2(C) の 346 と 223 cm^{-1} のバンドは多分ポルフィリン環の ν_8 及び ν_9 モード[22)23)]に由来する. 312 cm^{-1} のバンドは γ_7 モードの振動数[21)]に近いが, それを面外振動に帰属するには強度が強すぎる; γ_7 モードはピラミッド型変形の著しい deoxyMb で 302 cm^{-1} に弱く観測される程度で, MbCO や MbCN のような平面型では消える[21)]. それ故, 312 cm^{-1} のバンドが ν_{52} に由来すると考える方が最もらしく思える. ν_{52} は D_{4h} 対称の元では E_u 対称種に属する面内モードで, $C_{\beta}-C_1$ 変角振動に由来する[21)]. これらの面内振動のラマンバンドが 420 nm 吸収分子種に選択的に強く現れる事は, CO-ヘムがかなり平面である事を示唆する.

それとは対照的に, γ_{15} (694 cm^{-1}) や γ_1 (743 cm^{-1}) のような面外振動のラマンバンドは, エフェクター存在下の 407 nm 励起のスペクトル (図 2(A) と図 6(C)) でのみ観測され, 422 nm 励起のスペクトル (図 2(C)) では観測されなかった. 実際これらの面外振動は, 歪んだヘムを持つ iNOS の O_2 結合形に対して観測されている[24)]. iNOS の面外歪みの程度は, 684 cm^{-1} ($\gamma_{15}B_{2u}$, saddling), 708 cm^{-1} ($\gamma_{11}B_{1u}$, ruffling), 729 cm^{-1} (γ_5A_{2u}, doming), 743 cm^{-1} (γ_1A_{1u}, propeller) のバンド強度を用いて評価された. γ_{11} と γ_5 のバンドが sGC-CO のスペクトルに見られない事は ruffling や doming の変形が小さい事を示唆する.

Martin ら[14)]は YC-1 存在下の 312 cm^{-1} (図 2) と BAY 存在下の 309 cm^{-1} (図 6) のバンドを面外振動の γ_7 に帰属したが, γ_7 は A_{2u} 対称種に属し, そのラマンバンドはヘムの doming 変形が大きい時に強度増大する事が期待される[25)]. これらの u 型面外振動は D_{4h} 対称の元ではラマン禁制で, ヘムが少し歪んで対称性が低下しても, 一般的には強いバンドとしてラマンスペクトルに現れてこない. 実際, ヘム蛋白に対して観測されてきたポルフィリン環の強いラマンバンドは, 全て D_{4h} 対称のもとで許容のものであった. それ故, 実測された 312 (309) cm^{-1} のラマンバンドの強さは面外振動としては合理的に理解しにくいので, 我々は Martin らの帰属に同意できない.

ヘムの静的な面外変形が大きくなると, 面外振動と Fe-CO 伸縮振動とのカップリングが容易になる. 図 3 に示したように CO 同位体差ピークが低振動数領域のポルフィリンバンドに見られたのは, そのようなカップリングのためと我々は考えている. その現象が図 3(C) の BAY の場合にも見られる. $\nu_2, \nu_3, \nu_4, \nu_{10}$ のようなポルフィリン骨格振動の振動数は, BAY と GTP の存在下でもそれぞれ, 1579, 1496, 1370, 1627 cm^{-1} から 1583, 1500, 1372, 1631 cm^{-1} へ僅かしかシフトしていない.

BAY の存在下で 2 つの ν_{Fe-CO} バンドが 489 と 521 cm^{-1} に存在する事は, Kincaid らの報告[14)]に於いて強調されたが, 我々もその事を確認した. 489 cm^{-1} のバンドは His-配位の 6c sGC-CO に帰属され, それはエフェクターのない時に存在した 6c sGC-CO の ν_{Fe-CO} =473 cm^{-1} とは異なる. しかしこの帰属については, 反論もでている. Sharma ら[26)]は Hisβ105 が YC-1 あるいは BAY の窒素原子によって置き換えられていると主張している. それは, His の窒素を YC-1 や BAY のピリジン環の窒素に置き換えても配位数は変わらず, 吸収ピーク位置のシフトも僅かで, ν_{Fe-CO} バンドの 473 から 489 cm^{-1} へのシフトも理解できる上に, Fe(II)-Hisβ105 結合の切断が, 高い酵素活性を合理的に説明できると指摘している. GTP の存在がその変化を更に容易にする. もう一つの異なる説明は, Hisβ105 がシステイン残基あるいはメチオニン残基によって置き換えられている, という牧野らによるもの[16)]である. しかしこれら 2 つの提案は, 次に述べる理由によりラマンの実験結果に合わないので, 我々は賛成できない; 1) YC-1 と GTP 存在下の sGC-CO のラマン測定用レーザー光を強くすると CO が光乖離し, Fe(II)-His 伸縮ラマンバンドが観測されて, その振動数が, 精製したままの酵素のものと同じであった[27)]. 2) Cys の配位したヘムの ν_{Fe-CO} 振動数は His の配位したものに比べてかなり低い事が期待され, 実際に

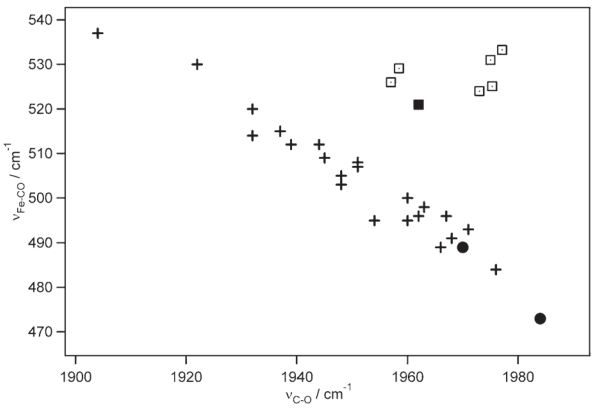

Figure 9. The ν_{Fe-CO} vs. ν_{C-O} plot. Crosses represent histidine-coordinated 6c CO-heme, and the two closed circles denote sGC-CO in the presence and absence of effectors. Open squares denote 5-coordinated heme-CO in proteins whereas a closed square denotes the 5-coordinated sGC-CO.

MbCO と P 450-CO との比較で既に確立されている[28]. 3) Met は強い配位子ではなく, 特別な条件が満たされない限り, His が Met に置き換えられる事は考え難い.

H_2O も弱いリガンドであり, H_2O の配位したヘムの ν_{Fe-CO} は高くなるので, CO のトランス位置に H_2O が配位している可能性[29]も考え難い. 実際, ν_{Fe-CO} 振動数を ν_{C-O} 振動数に対してプロットした図 9 で明らかなように, YC-1/BAY と GTP 存在下の sGC-CO はヒスチジン配位のヘム蛋白の直線[14)~16)]のうえにあり, S の配位したヘム蛋白の直線からずれている. この事も Met や Cys の配位を支持できない理由である. Vogel ら[30]は, 6 配位 CO ヘムの「ν_{Fe-CO} vs ν_{C-O} プロット」が第 5 配位子に特異的な直線を与える理由を, Fe(II) から CO への π-back donation が第 5 配位子と CO の周りの環境により決まる事を, 理論解析で明らかにしている. 興味ある事に, 489/1969 cm^{-1} と 473/1984 cm^{-1} の両方とも His 配位の直線にのるのに対して, 521/1962 cm^{-1} は 5 配位ヘムのブロックの低振動数端にくる (図 9). これは有機溶媒中に存在する 5c CO-ヘムに比べて Fe(II) から CO への π-back donation が大きい事を意味し, CO の周りにプラス電荷の残基が多い事を示唆する. 細菌 *Alcaligenes xyloxidans* のチトクロム c' に見られる[31]ように CO がプロキシマル側に結合している可能性については, CO の光乖離した sGC-CO の ν_{Fe-His} バンドが, 精製したままの sGC と同じ 204 cm^{-1} に現れたと云う事実[27]のために, 本研究からは支持できない.

では, 今回のラマンの実験でどういう情報が新しく得られたのか? という質問に対して応えたい. 結果のところで指摘したように, YC-1 と BAY が sGC-CO に与えた共通の効果が, 5c-と 6c-ヘムの 2 種を作り出した事であり, 両方のヘムに共通の構造的特色は, ビニル基やプロピオン酸基等のヘム側鎖がピロール環との平面性を著しく増加した事である. しかしながら, 5c ヘムには saddling と propeller 型面外変形が少し大きくなっている. 吸収スペクトル強度から判断すると, 6c ヘムの存在量については, sGC-CO/YC-1/GTP の 420 nm 吸収種 (図 1B) と sGC-CO/BAY/GTP の 419 nm 吸収種 (図 1C) がエフェクターのない時の 424 nm 吸収種 (図 1A) とあまり変わらないうえに, 5c ヘムの存在量 (sGC-CO/YC-1/GTP の 410 nm 吸収種と sGC-CO/BAY/GTP の 403 nm 吸収種) よりは多い. それ故, 5c sGC-CO のみが高い酵素活性を持つと云う考え方では説明しがたい. 5c や 6c CO ヘムの分子吸光係数がわからないので, 相対存在量の定量的評価は本研究では出来なかった.

一方, 細菌ガスセンサー蛋白質に対して, 鉄へのリガンド結合によるビニルやプロピオン酸基等のヘム側鎖のコンフォメーション変化がトリガーとなって蛋白の四次構造変化を誘起し, それが C 末端側にある効果器に伝達されて生理的効果を生み出すと云う考え[32)~34)]が提案されている. 従ってここで述べたような, CO とエフェクターと基質の共同作業による構造変化が, まずヘム側鎖とその周辺残基の間で局所的に起り, それが 4 次構造変化を通して, 離れたところにある酵素触媒グループに伝達されるメカニズムが考え易い. この構造変化は, ある種の張力をヘムと蛋白間に誘起し, その結果として一部の蛋白で Fe-Hisβ105 結合が切れる事も考えられる. それは, 張力のかかったヒトの NO ヘモグロビンの α サブユニットで実際起っている[10]. また, その構造緩和がプロピオン酸側鎖と Tyr135 や Arg139 との相互作用[5]を取り除き, Fe-Hisβ105 結合の切断無しに CO の周りの環境を変化させただけに終わる分子もあるかもしれない. この構造緩和には, ヘムの回転や並進が含まれる可能性もある. その事が, 2-位と 4-位のビニル基のスペクトル的な交換やビニル基とプロピオン酸基のピロール環との平面性を変える以外に, ν_8, ν_9, ν_{52} 等のヘム面内振動のラマン強度の増加につながっていると思われる. そのような点をよりはっきりさせるために UV 共鳴ラマンの測定が望まれる.

YC-1 或は BAY の存在下での 5c sGC-CO の量が, sGC-NO の場合とほぼ同じ酵素活性を説明するには少なすぎる[17]という事が問題とされてきた. 5c sGC-CO の量の定量には可視紫外吸収スペクトルが最も良い方法であり, 実際本研究では, 図 1B の 410 nm の吸収及び図 1C の 403 nm の吸収がそれを反映する. いずれにおいても 6c sGC-CO に比べて 5c sGC-CO の量が圧倒的に多いと云う事ではない. しかしより正確な定量のためには, それらの分子吸光係数の決定が必須である.

5. 結　　論

本研究の実測結果を説明する 2 つの考え方を提案した. その第 1 は, エフェクター無しの 6c sGC-CO の 418 nm 吸収帯 (図 1A), YC-1/GTP 存在下の 410 nm 吸収帯 (図 1B), BAY/GTP 存在下の 403 nm 吸収帯 (図 1C) がいずれも幅広く, よく似た強度をもつので, エフェクター無しの時の 6c sGC-CO の 418 nm 吸収分子種のみがエフェクターにより 5c に変えられ, もう 1 つの 6c sGC-CO の 424 nm 吸収分子種は 6c の 420 nm にシフトとしているというもの. 第 2 は, 6c の 418—420 nm 吸収分子種は常に存在し, 424 nm 吸収分子種のみが 5c に変えられる, というものである. 現段階ではそのいずれを正しいか, を決める決定的なデータはない. バンドが幅広くなっている理由をヘムの構造と関連付けて説明する事が, 次の段階では重要である. また, sGC-CO/YC-1 の 410 nm 吸収強度 (BAY の場合の 403 nm) と酵素活性が比例関係を持つかどうかを実験的に確かめる事も本質的である.

謝辞　本研究は日本学術振興会の科学研究費 (基板研究 B, 21350098) の支援のもとに実施した. 本研究の実施に当り, sGC 蛋白の精製及び共鳴ラマンの測定をして下さった, Dr. Biswajit Pal (Centre for Cellar and Molecular Biology, India), 酵素の精製を手伝い激励していただいた, 故津山伸吾教授 (大阪府立大学) 及びそのグループで現大阪府立大学農学部の竹中重雄先生と田中克弘先生, 及び理論の立場から結果の討論をしていただいた太田雄大博士 (九大先端化学研究所) に感謝する.

参 考 文 献

1) D. S. Bredt, S. H. Snyder, *Annu. Rev. Biochem.* **63** (1994) 175.
2) S. A. Waldman, F. Murad, *Pharmacol Rev.* **39** (1987) 163.
3) Y. Zhao, J. P. Schelvis, G. T. Babcock, M. A. Marletta, *Biochemistry* **37** (1998) 4502.
4) D. P. Ballou, Y. Zhao, P. E. Brandish, M. A. Marletta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002) 12097.
5) P. M. Schmidt, M. Schramm, H. Schroder, F. Wunder, J.P. Stasch, J. P. *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 3025.
6) D. S. Karow, D. Pan, R. Tran, P. Pellicena, A. Presley, R. A. Mathies, M. A. Marletta, *Biochemistry*, **43** (2004) 10203.
7) G. Deinum, J. R. Stone, G. T. Babcock, M. A. Marletta, *Biochemistry* **35** (1996) 1540.
8) T. Tomita, T, Ogura, S. Tsuyama, Y. Imai, T. Kitagawa, *Biochemistry* **36** (1997) 10155.
9) J. R. Stone, M. A. Marletta, *Biochemistry* **35** (1996) 1093.
10) K. Nagai, C. Welborn, D. Dolphin, T. Kitagawa, *Biochemistry* **19** (1980) 4755.
11) T. C. Bellamy, J. Wood, J, Garthwaite, *Proc Natl Acad Sci USA*. **99** (2002) 507.
12) J. R. Stone, M. A Marletta, *Biochemistry* **33** (1994) 5636.
13) A. Friebe, G. Schultz, D. Koesling, *EMBO J.* **15** (1996) 6863.
14) E. Martin, K. Czarnecki, V. Jayaraman, F. Murad, J. Kincaid, J. Am. Chem. Soc. **127** (2005) 4625.
15) Z. Li, B. Pal, S Takenaka, S. Tsuyama, T. Kitagawa, *Biochemistry,* **44** (2004) 939.
16) R. Makino, E. Obayashi, N. Homma, Y. Shiro, H. Hori, *J. Biol. Chem.*, **278** (2003) 11130.
17) S. P. L. Cary, J. A. Winger, E. R. Derbyshire, M. A. Marletta, *Trends Biochem. Sci.* **31** (2006) 231.
18) J. R. Stone, M. A. Marletta, *Chem. Biol.* **5** (1998) 255.
19) M. P. Marzocchi, G. Smulevich, *J. Raman Spectrosc.* **34** (2003) 725.
20) K. Uchida, Y. Susai, E. Hirotani, T. Kimura, T. Yoneya, H. Takeuchi, I. Harada, *J. Biochem.* **103** (1988) 979.
21) S. Hu, K. M. Smith, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 12638.
22) T. Kitagawa, M. Abe, H. Ogoshi, *J. Chem. Phys.* **69** (1978) 4516.
23) M. Abe, T. Kitagawa, Y. Kyogoku, *J. Chem. Phys.* **69** (1978) 4526.
24) D. Li, D, Stuehr, S-R. Yeh, D. Rousseau, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 26489.
25) X-Y. Li, R. S. Czernuszewicz, J. R. Kincaid, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 71012.
26) V. S. Sharma, D. Magde, V. G. Kharitonov, D. Koesling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254** (1999) 188.
27) B. Pal, T. Kitagawa, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 267.
28) T. G. Spiro, I. H. Wasbottom, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 34.
29) T. Ohta, B. Pal, T. Kitagawa, *J. Phys. Chem. B.* **109** (2005) 21110.
30) K. M. Vogel, P. M. Kozlowski, M. Z. Zgierski, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 9915.
31) D. M. Lawson, C. E. Stevenson, C. R. Andrew. R. R. Eady, *EMBO J.* **19** (2000) 5661.
32) S. F. El-Mashtoly, H. Takahashi, T. Shimizu, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 3556.

33) S. F. El-Mashtoly, S. Nakashima, A. Tanaka, T. Shimizu, T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 19000.

34) S. F. El-Mashtoly, Y. Gu, H. Yoshimura, S. Yoshioka, S. Aono, T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.* **28** (2008) 6942.